

03500.017349.

PATENT APPLICATION



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Entire Application of:

KAZUHIRO TAKADA

Application No.: 10/725,396

Filed: December 3, 2003

For: PROBE CARRIER, METHOD OF  
PRODUCING THE PROBE  
CARRIER, METHOD OF  
EVALUATING THE PROBE  
CARRIER AND METHOD OF  
DETECTING A TARGET NUCLEIC  
ACID USING THE SAME

)  
:  
Examiner: Not Yet Assigned

)  
:  
Group Art Unit: Not Yet Assigned

)  
:  
February 24, 2004

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

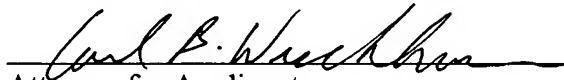
Sir:

In support of Applicant's claim for priority under 35 U.S.C. § 119, enclosed is  
a certified copy of the following foreign application:

2002-191224 filed June 28, 2002.

Applicant's undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,

  
Attorney for Applicant

Registration No. 43,279

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3800  
Facsimile: (212) 218-2200

NY\_MAIN 408701v1

CF0 17349  
vs/o

10/725,396

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 2 年 6 月 2 8 日

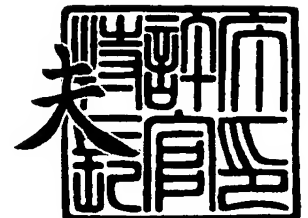
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 1 9 1 2 2 4  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 2 - 1 9 1 2 2 4 ]

出 願 人  
Applicant(s): キヤノン株式会社

2 0 0 3 年 1 2 月 1 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 3 7 9 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 4738033

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 プローブ担体、プローブ担体の作成方法及びプローブ担体の評価方法

【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 高田 一広

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブ担体、プローブ担体の作成方法及びプローブ担体の評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブが固定されていることを特徴とするプローブ担体。

【請求項 2】 前記金を含有する膜は、111方位の単結晶薄膜からなる請求項 1 記載のプローブ担体。

【請求項 3】 前記金単結晶薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で $0.5\text{nm}$ 以下である請求項 1 記載のプローブ担体。

【請求項 4】 前記担体と前記一本鎖DNAプローブを介する硫黄原子が、一本鎖DNAプローブの官能基として形成されている請求項 1 記載のプローブ担体。

【請求項 5】 前記一本鎖DNAプローブ中に官能基としてチオール基を有する請求項 1 記載のプローブ担体。

【請求項 6】 前記一本鎖DNAプローブを前記担体に固定化する際に、該担体に該一本鎖DNAプローブを付与する方法として、インクジェット法を用いる請求項 1 記載のプローブ担体。

【請求項 7】 前記金を含有する膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、前記担体上に金の単結晶薄膜を形成する方法を用いる請求項 1 に記載のプローブ担体。

【請求項 8】 金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブが固定されているプローブ担体の製造方法であって、

担体上に金を含有する膜を形成する工程と、

該膜に一本鎖DNAプローブを硫黄原子を介して固定化する工程とを有することを特徴とするプローブ担体の作製方法。

【請求項 9】 前記金を含有する膜は、111方位の単結晶薄膜からなる請求項 8 記載の作製方法。

【請求項 10】 前記金単結晶薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で $0.5\text{nm}$ 以下である請求項 8 記載の作製方法。

【請求項 1 1】 前記担体と前記一本鎖DNAプローブを介する硫黄原子が、一本鎖DNAプローブの官能基として形成されている請求項 8 記載の作製方法。

【請求項 1 2】 前記一本鎖DNAプローブを前記担体に固定化する際に、該担体に該一本鎖DNAプローブを付与する方法として、インクジェット法を用いる請求項 8 記載の作製方法。

【請求項 1 3】 前記金を含有する膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、前記担体上に金の単結晶薄膜をする方法を用いる請求項 8 に記載の作製方法。

【請求項 1 4】 前記金を含有する膜が、パターニングされた金の単結晶からなる膜である請求項 8 ～ 1 3 のいずれかに記載の作製方法。

【請求項 1 5】 前記パターニング方法として、担体上に電子線またはイオンの照射処理を用いる請求項 1 4 に記載の作製方法。

【請求項 1 6】 請求項 8 ～ 1 5 のいずれかに記載の方法で作製されたプローブ担体の形状を走査型プローブ顕微鏡で観察及び検査することを特徴とするプローブ担体の評価方法。

【請求項 1 7】 標的核酸の検出のための一本鎖DNAプローブを有するプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法において、

該プローブ担体が、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載されるプローブ担体であることを特徴とする標的核酸の検出方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は金を含有する膜に一本鎖DNAプローブを固定化したプローブ担体、その製造方法、その評価方法及びこのプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

核酸の塩基配列の決定やサンプル中の標的核酸の検出、各種細菌の同定を迅速、正確に行ない得る技術の一つとして、例えば該標的核酸と特異的に結合し得る

物質、いわゆるプローブを固相上に多数並べたプローブアレイの使用が提案されている。このようなプローブアレイの一般的な製造方法としては、例えば

- (1) 固相上で核酸プローブを合成していく方法、や
- (2) 予め合成した核酸プローブを固相上に供給する方法等が知られている。

#### 【0003】

上記(1)の方法の詳細が開示されている先行技術としては例えば米国特許第5405783号公報(USP 5405783)が挙げられる。

#### 【0004】

また、上記(2)の方法としては、例えば米国特許第5601980号公報(USP 5601980)や「サイエンス (Science)」、第270巻、467頁、(1995)にはマイクロピペッティングを用いてcDNAをアレイ状に並べる方法が開示されている。

#### 【0005】

ところで、上記(1)の方法は、固相上で直接核酸プローブを合成させている為、予め核酸プローブを合成する必要がない。しかし固相上で合成されたプローブ核酸を精製することは困難である。プローブアレイを用いた核酸塩基の配列決定や、サンプル中の標的核酸の検出等の精度は、核酸プローブの塩基配列の精度に大きく依存する。従って上記(1)の方法は、より高品質なプローブアレイの製法としては核酸プローブの精度の向上に更なる改良が求められるところである。

#### 【0006】

一方、上記(2)の方法は、核酸プローブの固相への固定に先立って核酸プローブの合成ステップが必要となる反面、固相への結合に先立って核酸プローブを精製することができる。この理由により現段階においては、より高品質なプローブアレイの製法としては上記(2)の方法は、上記(1)の方法よりも好ましいと考えられる。

#### 【0007】

しかし上記(2)の方法の課題は、核酸プローブを固相に高密度にスポットティングする方法にある。例えばプローブアレイを用いて核酸の塩基配列決定を行な



う場合、できる限り多種の核酸プローブを固相上に配置しておくことが好ましい。また遺伝子の変異の検出を効率的に行なう場合には、それぞれの変異に対応した配列を有する核酸プローブを固相上に配置させておく事が好ましい。さらに、サンプル中の標的核酸の検出や、遺伝子の変異、欠損の検出に当たっては、被験者からのサンプルの採取、具体的には血液等の採取はできる限り少量に止めておくことが好ましく、よって少量の検体でできる限り多くの塩基配列の情報を獲得できることが好ましい。

#### 【0008】

上記(2)の手法で核酸プローブを固定する基板表面には、プローブと強固に結合するための機能と平滑性が望まれる。従来からよく用いられている材料としては、ガラス、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、その混合物等)、金属(例えば、金、プラチナ等)が含まれる。通常はこれら表面上に直接プローブを固定するためには化学結合を用いるために、プローブと表面の結合部位の官能基を反応性の高いものの組合わせを選択する。そのため基板表面にプローブとの結合を行う結合層を設ける必要がある。大抵の場合において、厚さが単分子厚～約1mmの範囲のものを、単層あるいは複数層設けることでプローブと基板を強固に固定することが行われる。

#### 【0009】

又、基板上に形成されたプローブ自体はナノメートルオーダーの構造を有するものであるために、それ自体を観察あるいは評価しようとした場合、しばしば走査型プローブ顕微鏡が用いられることが多かった。ここで記述する走査型プローブ顕微鏡とは、微細な針を試料表面に近づけることで、原子レベルでの観察が可能な走査型顕微鏡の総称を意味し、走査型トンネル顕微鏡(STM: Scanning Tunneling Microscopy)や原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscopy)およびこれらの技術を基盤として派生してきた顕微鏡の観察手法等を意味する。走査型プローブ顕微鏡によるDNAの観察に関しては、既に報告されているものが多数あるが、金属基板を超高真空中で処理して、そこにDNAを形成させるという、いわば観察に適した状態で試料を作成することが必須であった。

#### 【0010】

**【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、上記従来のプローブを形成する手法では、基板処理以外に、プローブと基板を強固に結合させるための結合層を基板上に形成するために、その作製工程が必要であり、プローブを作製するための手間と時間を要した。また、通常このようにして形成されたプローブの表面を走査型プローブ顕微鏡等で観察を行う際に、結合層の凹凸が反映されるために、ナノメートルオーダーのプローブ自体の形状観察を行うには適当ではなかった。

**【0011】**

そこで本発明は上述の問題点を解消するためになされたものであって、本発明の目的は作成工程が容易に平滑な面を有する担体を作成すると共に、該担体に結合層等を形成することなく、極めて微量の一本鎖DNAプローブを該プローブに損傷を与えることなく、かつ効率的に正確に固定化する方法を提供することを目的とする。

**【0012】**

本発明の他の目的は、少量の検体からでもDNAに関するより多くの情報をより正確に検査可能なプローブアレイなどのプローブ担体を提供することにある。

**【0013】**

本発明の他の目的は、担体上のプローブアレイを走査型プローブ顕微鏡及びその派生技術の手法を用いて正確にその形状等を観察及び検査できうる構造のプローブ担体を提供することにある。

**【0014】****【課題を解決するための手段】**

本発明は、上述した課題を解決するために鋭意検討を行って成されたものであり、以下に述べる構成のものである。

**【0015】**

すなわち、本発明にかかるプローブ担体は、金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブが固定されていることを特徴とするプローブ担体である。

**【0016】**

本発明にかかるプローブ担体の作製方法は、金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブが固定されているプローブ担体の製造方法であって、

担体上に金を含有する膜を形成する工程と、

該膜に一本鎖DNAプローブを硫黄原子を介して固定化する工程とを有することを特徴とするプローブ担体の作製方法である。

#### 【0017】

また、本発明にかかるプローブ担体の評価方法は、上記の方法で作製されたプローブ担体の形状を走査型プローブ顕微鏡で観察及び検査することを特徴とするプローブ担体の評価方法である。

#### 【0018】

本発明にかかる標的核酸の検出方法は、標的核酸の検出のための一本鎖DNAプローブを有するプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法において、

該プローブ担体が、上記構成のプローブ担体であることを特徴とする標的核酸の検出方法である。

#### 【0019】

本発明によれば、平滑面を形成できる金を含有する膜上に官能基としてチオール基を有する一本鎖DNAプローブを固定化するので、金とチオール基との結合により硫黄原子を介した強固な結合が形成され、担体に強固に結合した一本鎖DNAプローブを有するプローブ担体を提供することができる。また、本発明で使用している金を含有する膜は極めて平坦性が高く、大気中でも酸化されにくく、非常に安定であるため、走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で直接プローブの評価をすることが可能となった。

#### 【0020】

##### 【発明の実施の態様】

本発明において担体上に固定されたプローブは、特定の標的物質に対して特異的に結合可能なものであり、標的核酸の有する塩基配列と相補的な配列をプローブが有することで、これらのハイブリッド体を形成し得るものである。

#### 【0021】

担体としては、各種形状及び材料からなり、金を含有する膜の形成が可能であるものから選択することができ、例えばガラス基板などが好適に利用できる。

#### 【0022】

プローブを構成する核酸としては、一本鎖DNAが利用され、これは合成されたもの、ゲノムDNAやcDNAとして取得したものから所望のプローブ機能を有する部分を取り出したものなどを利用することができる。

#### 【0023】

担体上への一本鎖DNAプローブの固定化は後述するとおり金を含有する膜とチオール基との反応により行われる。その際、これらの結合部がハイブリダイゼーションに影響を与えないように結合部の配置を考慮することが好ましい。

#### 【0024】

本発明においては、ドットやスポットなどの形状でプローブが固定されたプローブ固定領域を担体上に有するものをプローブ担体といい、プローブ固定領域の複数あるいは多数のそれぞれを互いに独立させて担体上の所定位置に、マトリックス状などの配置で配列したものをプローブアレイという。なお、このプローブ担体には、通常、マイクロアレイ、DNAチップ等の核酸チップなどといわれているものも含まれる。

#### 【0025】

金を含有する膜としては、111方位の単結晶薄膜が好ましく、金単結晶薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で $0.5\text{nm}$ 以下、膜厚は $5\mu\text{m}$ 以下であることが更に好ましい。また、担体と一本鎖DNAプローブを介する硫黄原子は、一本鎖DNAプローブの官能基として導入されたものであることが好ましい。また、金を含有する膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、担体上に金の単結晶薄膜を形成する方法を好適に用いることができる。

#### 【0026】

以下、図を参照しつつ本発明の好ましい一態様について説明する。図1は、担体としての基板に選択的に金単結晶を堆積させる金結晶薄膜形成装置の概略図である。同図において、12は溶液槽、14は溶液、13は溶液の温度を測定する熱電対等の温度測定素子、15は溶液14を加熱するためのヒータ、11は熱電

対 13 により得られた温度の信号をもとにヒータ 15 に印加する電圧を制御し、溶液の温度を一定に保つための機構を有する電源である。

#### 【0027】

上記の装置を用いて本発明の DNA チップの形成法について以下に説明する。まず基板の作成工程について説明する。

#### 【0028】

はじめに基板上に金の薄膜の形成を行う。基板としては種々のガラスや金属、シリコン等を用いることができる。まず溶液層 12 に蒸留水を入れヨウ化カリウム及びヨウ素を投入してヨウ素水溶液を形成した後、金を投入し攪拌溶解させ、溶液 14 として  $[\text{AuI}_4]^-$  を含有する金錯体溶液を形成する。このとき溶液中には、金錯体  $[\text{AuI}_4]^-$  の他、 $\text{I}_3^-$ 、 $\text{K}^+$  が存在するものと考えられる。

#### 【0029】

ヨウ素水溶液は、ヨウ化カリウム以外のヨウ化化合物、例えばヨウ化アンモニウムを溶解することでも作成出来る。また、アルコールを溶媒として用いたヨウ素アルコール溶液やアルコールと水の混合物を溶媒として用いたヨウ素アルコール・水溶液も本発明に用いることができる。溶液中のヨウ素、ヨウ化化合物の濃度は、溶解することできる金の量を左右する。

#### 【0030】

次いで、前記基板 10 の表面を溶液に接した後、ヒータ 15 によって溶液 14 を加熱し溶液 14 を  $30 \sim 100^\circ\text{C}$  の所望の温度に昇温し、一定の温度になる様に電源 11 で制御し、ヨウ素成分の揮発を促進させる。

#### 【0031】

溶液 14 系内では、 $\text{I}_3^-$  の状態で存在するヨウ素成分の揮発による、溶液系内の平衡状態の維持の為に  $[\text{AuI}_4]^-$  からの I 成分の解離による分解、又は  $[\text{AuI}_4]^-$  の形で存在する錯体中のヨウ素成分の直接の揮発による分解が進行すると考えられ、結果として金が過飽和状態となる。

#### 【0032】

溶液 14 中で過飽和状態となった金は、基板表面にランダムな核として析出し、その後核が自己整合的に成長し単結晶膜が形成される。

## 【0033】

作成された金単結晶膜のX線回折測定を行ったところ、欠陥のない単結晶であり、111方位を有していることがわかった。

## 【0034】

次に、ここまでで形成された基板上に一本鎖DNAプローブの形成を行う。初めにチオール基が結合したDNAプローブの合成を行う。例えばDNA自動合成機を用いてDNAを自動合成する際に5'末端の試薬として5'-Thiol-ModifierC6 (Glen Research社製)を用いることにより合成することができ、通常の脱保護反応の後、高速液体クロマトグラフィーにより精製することで得られる。DNAプローブの金基板へのスポッティングは、インクジェット技術を用いて吐出させて形成する。

## 【0035】

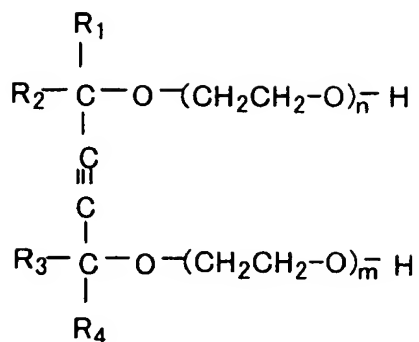
該液体のインクジェット吐出特性、及び液体中及びバブルジェット吐出時のDNAプローブの安定性を考慮して適当な濃度で含有させることが好ましい。

## 【0036】

バブルジェットヘッドから吐出される液体の組成としては、上記した様にDNAプローブと混合したとき、及びバブルジェットヘッドから吐出させたときにDNAプローブに対して影響を実質的に与えないものであって、且つバブルジェットヘッドを用いて固相に対して正常に吐出可能である液体組成が好ましい条件を満たせば、特に限定されるものでないが、例えばグリセリン、尿素、チオジグリコール又はエチレングリコール、イソプロピルアルコール及び下記式(I)で示されるアセチレンアルコールを含む液体は好ましいものである。

## 【0037】

## 【化1】



式 (I)

## 【0038】

(上記式 (I) 中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ はアルキル基、具体的には例えば炭素数1~4の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基を表わし、 $m$ 及び $n$ は各々整数を表わし、 $m=0$ 且つ $n=0$ であるか、 $1 \leq m+n \leq 30$ であるか、あるいは $m+n=1$ の場合に $m$ または $n$ は0である。)

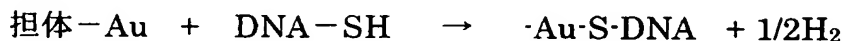
更に具体的には尿素を5~10wt%、グリセリンを5~10wt%、チオジグリコールを5~10wt%、及び上記式 (I) で示されるアセチレンアルコールを0.02~5wt%、より好ましくは0.5~1wt%を含む液体が好適に用いられる。

## 【0039】

この液体を用いた場合、バブルジェットヘッドから核酸プローブを含む液体を吐出させて固相上に付着させたときは、液体に含有されているチオール基と金薄膜が選択的に結合する。金とチオールとの反応は以下の式で起こると考えられている。

## 【0040】

## 【化2】



## 【0041】

上記選択的反応により、一本鎖DNAプローブは、基板上に形成された金の上のみ選択的に形成される。

## 【0042】

この様にして作製するプローブアレイはその用途に応じて、例えば同じDNAプローブを含む複数のスポットを有するように構成してもよく、また異種のDNAプローブを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。そしてこの様な方法によってDNAプローブが高密度に配置されたプローブアレイは、その後標的一本鎖DNAの検出や、塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的一本鎖DNAの検出に用いる場合には、該標的一本鎖DNAの塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAをプローブとして用い、該プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブアレイを用意し、該プローブアレイの各々のスポットに、サンプルを供給して該標的一本鎖DNAとDNAプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。それによってサンプル中の標的物質の有無の検出を行なうことができる。またサンプル中に含まれている標的一本鎖DNAの塩基配列の特定に用いる場合には、該標的一本鎖DNAの塩基配列の複数の候補を設定し、該塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAをプローブとして該固相にスポットティングする。次いで各々のスポットにサンプルを供給して該標的一本鎖DNAとDNAプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより標的一本鎖DNAの塩基配列の特定を行なうことができる。

## 【0043】

これまでの手順で、一本鎖DNAプローブを基板上に形成する方法を説明したが、本基板の特徴として、一本鎖DNAプローブが結合している金の表面の平滑性が非常に高いという点が挙げられる。加えて、金であるために、酸化されにくく大気中に放置しても安定に平滑な表面を維持しているという特徴を有している。この特徴を利用して、例えば一本鎖DNAプローブの形態を直接走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で観察することが可能となる。また、基板として絶縁性材料からなるDNAチップの場合には、原子間力顕微鏡でしか観察することができなかったが、本DNAチップの基板は導電性を有するために、トンネル電



流をモニターする、STMでの観察も可能である。

#### 【0044】

次に、金をパターンニングしてDNAチップを形成する方法について説明する。図2は、パターンニング基板の作成を実施するための装置の概略構成図である。金を含む膜のパターンニングには、電子線やイオンを照射して金の薄膜の形成が可能な領域と、そうでない領域とからなる潜像を形成してそれを利用する方法が好適である。

#### 【0045】

同図において、20は試料保持台、21は真空気密可能な潜像室、22は基板に潜像層を形成するのに必要な反応処理ガスを導入するためのガス導入口、24は基板10を潜像室21に導出入するための真空気密可能なゲートバルブ、25は潜像室21内を真空排気可能で排気速度が制御可能な真空排気装置、26はエネルギービーム発生源である光源、但しここではKrFエキシマレーザーを用い、28は所望のパターンを持つマスク27をエキシマレーザー光で照射するための照明光学系、29はマスクの像を基板10表面に結像するための投影光学系、23はエキシマレーザー光を透過しかつ真空気密可能な光入射窓、ここでは材質として熔融石英を用いた。

#### 【0046】

金をパターンニングした基板を作成するために、まずゲートバルブ24を開け、例えばシリコン等の基板10を試料保持台20に載せ、ゲートバルブ24を閉じ真空排気装置25によって潜像室21内の圧力が $10^{-7}$ Torr以下になるまで真空排気する。ガス導入口22より $O_2$ 等の潜像用ガスを潜像室21内に導入し内部の圧力が0.1Torr～760Torrの範囲で、所定の圧力になる様に真空排気装置25の排気速度を制御する。次にKrFエキシマレーザー26で発振させた波長248nmのレーザー光を照明光学系28によって所望にパターンを有するマスク27に均一に照射し、投影光学系29によって基板10にマスク27のパターン像を光入射窓23を通して結像させる。マスク像が結像した基板表面では、光が当たった部分のみで潜像用ガスとSi基板が光化学反応を起こし潜像層が形成される。潜像ガスとして $O_2$ を用いているので潜像層の組成は酸化シリコンとなる。所望の厚

さ(2~10nm)に潜像層が形成された後、ガスの供給を止め、潜像室21内の圧力が $10^{-7}$ Torr.以下になるまで真空排気する。ゲートバルブ24を開いて基板20を取り出す。ここで光源として、KrFエキシマレーザーを用いたが、試料表面で光化学反応を起こす波長であれば特に限定されず、キセノンランプ、高圧水銀灯等のランプ光源や、ArFエキシマレーザー、XeClエキシマレーザー、Arレーザー等の光源も使用可能である。なお光入射窓23の材質として波長248nmのレーザー光を吸収せずに透過させるため熔融石英を使用した。この他、 $\text{CaF}_2$ 、 $\text{MgF}_2$ 、 $\text{LiF}_2$ 、サファイアガラス等も使用可能で、要するに光源で発光する光を透過し、潜像室の内外の圧力差にたえられるものであれば特に限定されるものではない。

#### 【0047】

次に前記工程で作成された基板上に金の形成を行う。手法的には既述の方法をそのまま用いればよい。図1に示した薄膜形成装置を用い、基板10を溶液槽12に浸漬する。溶液14中で過飽和状態となった金が、潜像層が形成されていない核形成密度の高い基板表面のみにランダムな核として析出し、その後核が自己整合的に成長し単結晶膜が形成される。一方潜像層表面は $\text{SiO}_2$ になっており、 $\text{SiO}_2$ 表面は核形成密度が低いため潜像層上には、金単結晶は形成されなかった。

#### 【0048】

$\text{Si}$ の露出部分が $40\mu\text{m}\phi$ 以上では、複数の核から成長が始まりやがて、結晶どうしが衝突し、粒界が形成され、核形成密度の大きい材料からなる面を覆い、平均粒径約 $80\mu\text{m}$ 程度の単結晶群からなる金結晶薄膜が選択的に形成出来た。

#### 【0049】

ここまでで基板上にパターニングされた金の薄膜が形成されたので、あとはそのパターニングのパターンに合わせて、上述した手法で、チオール基が結合したDNAプローブをインクジェット技術を用いて吐出させて形成すればDNAチップが作成できる。

#### 【0050】

**【実施例】**

以下、具体的な実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではなく、本発明の目的が達成される範囲内の各要素の置換や設計変更がなされたものをも包含する。また、実施例内で用いている符号は、図1で記述してある符号と同一である。

**【0051】****【実施例1】**

初めに図1に示した装置を用い、金単結晶薄膜の作成を行った。蒸留水500mlにヨウ化カリウム40g及びヨウ素6gを投入して攪拌溶解させた。この溶液に金を3g投入して攪拌溶解させた。溶解後、この溶液から100ml分取して反応容器にいれ、ここにさらに蒸留水を500ml加えて攪拌し結晶成長用溶液14とし溶液槽12に入れた。

**【0052】**

基板10としてSiを用い、結晶成長用溶液14に浸漬した。次いで溶液を80℃に加熱して放置した。1.5時間後基板を取り出し観察したところ、Si基板上に111面を有する単結晶群が形成されていた。各単結晶間には粒界が形成されていた。単結晶の平均粒径は約10 $\mu$ mであった。膜の厚さは約300nmであった。STMで観察した結果、個々の単結晶表面の凹凸は、1 $\mu$ m角内で0.4nmであった。

**【0053】**

次に、DNAプローブとして5'末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してチオール基を結合したチミン（以降「T」と記載）からなる75量体のオリゴマーを用意した。これをバブルジェットプリンター吐出用溶液に調整し、この液体をバブルジェットプリンターを用い、上記で処理した金薄膜が形成された基板を装着し、プローブDNAを含む液体をガラス板上にスポッティングした。

**【0054】**

ここまでで作成されたDNAチップをDigital Instruments社製 走査型プローブ顕微鏡を用いてタッピングモードAFMの手法を用いて観察した。チップはシリコン単結晶製プローブ（商品名：D-NCH）を使用した。すると金の原子ステップ上にDNAが形成されている像を得ることができた。

## 【0055】

## 【実施例 2】

図 2 に示した装置を用い、まず第一の工程を行なった。ゲートバルブ 24 を開け Si 基板 10 を潜像室 21 に導入し試料保持台 20 に載せ、ゲートバルブ 24 を閉じた。真空排気装置 25 によって潜像室 21 内の圧力が  $10^{-7}$  Torr 以下になるまで真空排気した。ガス導入口 22 より酸素を流量 800 sccm で潜像室 21 内に導入し真空排気装置 25 の排気速度を制御し該内部の圧力を 10 torr に設定した。次に KrF エキシマレーザー光源 26 で発振させた波長 248nm のレーザー光を照明光学系 27 によって所望にパターンを有するマスク 28 に均一に照射し、投影光学系 29 によって基板 10 にマスク 28 のパターン像を結像させ 10 分間照射 (Si 基板 100 表面で照射光強度  $100 \text{ mW/cm}^2$ ) し潜像層を形成した。照射終了後ガスの供給を止め、潜像室 21 内の圧力が  $10^{-7}$  torr 以下になるまで真空排気した。潜像室 21 に窒素ガスを導入し大気圧に戻しゲートバルブ 24 を開け潜像層を形成した Si 基板を取り出した。

## 【0056】

次に、図 1 に示した装置を用い、実施例 1 と同様の方法で Si 基板上に金の薄膜を形成させた。

## 【0057】

DNA プローブとして 5' 末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してチオール基を結合したチミン (以降「T」と記載) からなる 75 量体のオリゴマーを用意した。これをバブルジェットプリンター吐出用溶液に調整し、この液体をバブルジェットプリンターを用い、前工程で作成された金のパターンに合せてプローブ核酸を含む液体をガラス板上にスポッティングし形成させた。

## 【0058】

図 3 (a) は作成されたプローブアレイの概略平面図、図 3 (b) は (a) の A-A' 断面図の模式図である。

## 【0059】

ここまでで作成された DNA チップを Digital Instruments 社製 走査型プローブ顕微鏡を用いてタッピングモード AFM の手法を用いて観察した。チップはシリ

コン単結晶製プローブ（商品名：D-NCH）を使用した。すると金の原子ステップ上にDNAが形成されている像を得ることができた。

#### 【0060】

##### 【実施例3】

図4に示した電子ビームを用いたパターニング装置を用いた例を説明する。Si基板10を試料保持台20に載せ、ゲートバルブ24を閉じた。真空排気装置25によって潜像室21内の圧力が $10^{-7}$  torr以下になるまで真空排気した。ガス導入口22より流量10 sccmの酸素を導入し、潜像室21内の圧力を $3 \times 10^{-3}$  torrにした。次に電子ビーム発生部41を動作させ、即ち電子銃40で電子を発生させ、電子光学系42で電子ビーム43を2 kVに加速し、膜表面に直径0.4  $\mu$ mのスポットサイズで収束させ、不図示の駆動装置によって試料保持台20を設置したステージを電子ビームシャッター（図示せず）と連動させ二次元的に移動させることによって、マスクを用いずに所望のパターンの潜像層を形成した。照射終了後ガスの供給を止め、潜像室21内の圧力が $10^{-7}$  torr以下になるまで真空排気した。潜像室21に窒素ガスを導入し大気圧に戻しゲートバルブ24を開け潜像層を形成したSi基板を取り出した。後の工程は実施例2と同様に行った。

#### 【0061】

##### 【実施例4】

DNA自動合成機を用いて以下の配列の一本鎖DNAを合成した。なお配列番号1の一本鎖DNA末端にはDNA自動合成機での合成時にチオールモディファイア（Thiol-Modifier）（グレンリサーチ（Glen Research）社製）を用いる事によってチオール（SH）基を導入した。続いて通常の脱保護を行いDNAを回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

配列番号：1

5'HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-PO<sub>2</sub>-O-ACTGGCCGTCGTTTTACA3'

引き続き、DNA自動合成機を用いて配列番号2～4の一本鎖核酸を合成した。なお配列番号2～4の一本鎖核酸は、配列番号1を基本とし、1塩基変化したものを配列番号2、3塩基変化したものを配列番号3、そして6塩基変化したものを配列番号4とした。

せたものを配列番号 4 とした。また配列番号 1 ~ 4 の一本鎖 DNA 末端には DNA 自動合成機での合成時に Thiol-Modifier (Glen Research 社製) を用いる事によってチオール (SH) 基を導入した。続いて通常の脱保護を行い DNA を回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。配列番号 2 ~ 4 の配列を以下に示す。

配列番号: 2

5' HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-PO<sub>2</sub>-O-ACTGGCCGTTGTTTTACA3'

配列番号: 3

5' HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-PO<sub>2</sub>-O-ACTGGCCGCTTTTTTACA3'

配列番号: 4

5' HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-PO<sub>2</sub>-O-ACTGGCATCTTGTTTACA3'

上記配列番号 1 ~ 4 の一本鎖 DNA を用いて、上記実施例に記載した方法と同様の方法で 4 種類の吐出用液体を調製し、バブルジェットプリンタ用の 4 つのインクタンクに各々の液体を充填し、各々のインクタンクをバブルジェットヘッドに装着した。次いで該プリンタに上記 (1) と同じ方法で作成したガラス板を装着し、該ガラス板上に 4 種の DNA プローブの各々を金薄膜上にスポッティングした。

配列番号 1 の DNA と相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を DNA 自動合成機で合成し、5' 末端にローダミンを結合させて標識化一本鎖 DNA を得た。この標識化一本鎖 DNA を 1 M NaCl / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に最終濃度 1  $\mu$ M となるように溶解し、(4) で得られたプローブアレイとハイブリダイゼーション反応を 3 時間行った。その後、プローブアレイを 1 M NaCl / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 溶液にて洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖 DNA を洗い流した。次に該プローブアレイの各々のスポットを蛍光顕微鏡 (ニコン (株) 社製) で観察し、その蛍光量を、画像解析装置 (商品名: ARGUS 50; 浜松ホトニクス (株) 社製) を接続し、ローダミン B に適するフィルターセットを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて定量した。

【0062】

標識化一本鎖DNAと完全マッチである配列番号1のDNAプローブのスポットでは4600の蛍光量であるのに対し、1塩基のミスマッチ配列を有する配列番号2のDNAプローブのスポットでは、2800の蛍光量が得られた。また、3塩基ミスマッチを有する配列番号3のDNAプローブのスポットでは、2100と完全マッチの半分以下の蛍光量しか得られず、6塩基ミスマッチの配列番号4のDNAでは蛍光は観測されなかった。以上の事から、DNAアレイ基板上で完全相補性の一本鎖DNAを特異的に検出することができた。

#### 【0063】

##### 【発明の効果】

本発明のプローブ担体、その作製方法、その評価方法、及びそれを用いた標的物質の検出方法によれば、平滑な面を形成し得る金薄膜上に官能基としてチオール基を有する一本鎖DNAプローブを反応させて硫黄原子を介した結合を形成することで、これらの間に強固な結合が形成され、担体に強固に結合した一本鎖DNAプローブを有するプローブ担体を提供することができた。また、本発明で使用している金薄膜は極めて平坦性が高く、大気中でも酸化されにくく、非常に安定であるため、走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で直接プローブの評価をすることが可能となった。

#### 【0064】

##### 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>CANON INC.

<120>Analysis method of nucleic acid hybrid by TOF-SIMS using halogen-marker

<130>4738033

<160>4

<210>1

<211>18

<212>DNA

<220>

<223>Probe sequence for Hybridization test

<400>1

actggccgtc gttttaca 18

<210>2

<211>18

<212>DNA

<220>

<223>Probe sequence for Hybridization test

<400>2

actggccggtt gttttaca 18

<210>3

<211>18

<212>DNA

<220>

<223>Probe sequence for Hybridization test

<400>3

actggccgct tttttaca 18

<210>4

<211>18

<212>DNA

<220>

<223>Probe sequence for Hybridization test

<400>4

actggcatct tgtttaca 18

【図面の簡単な説明】

【図 1】

金結晶薄膜形成装置の概略図である。

【図 2】

パターンニング基板の作成を実施するための装置の概略構成図である。



**【図 3】**

(a) はプローブアレイの概略平面図であり、(b) は (a) の A-A' 断面図である。

**【図 4】**

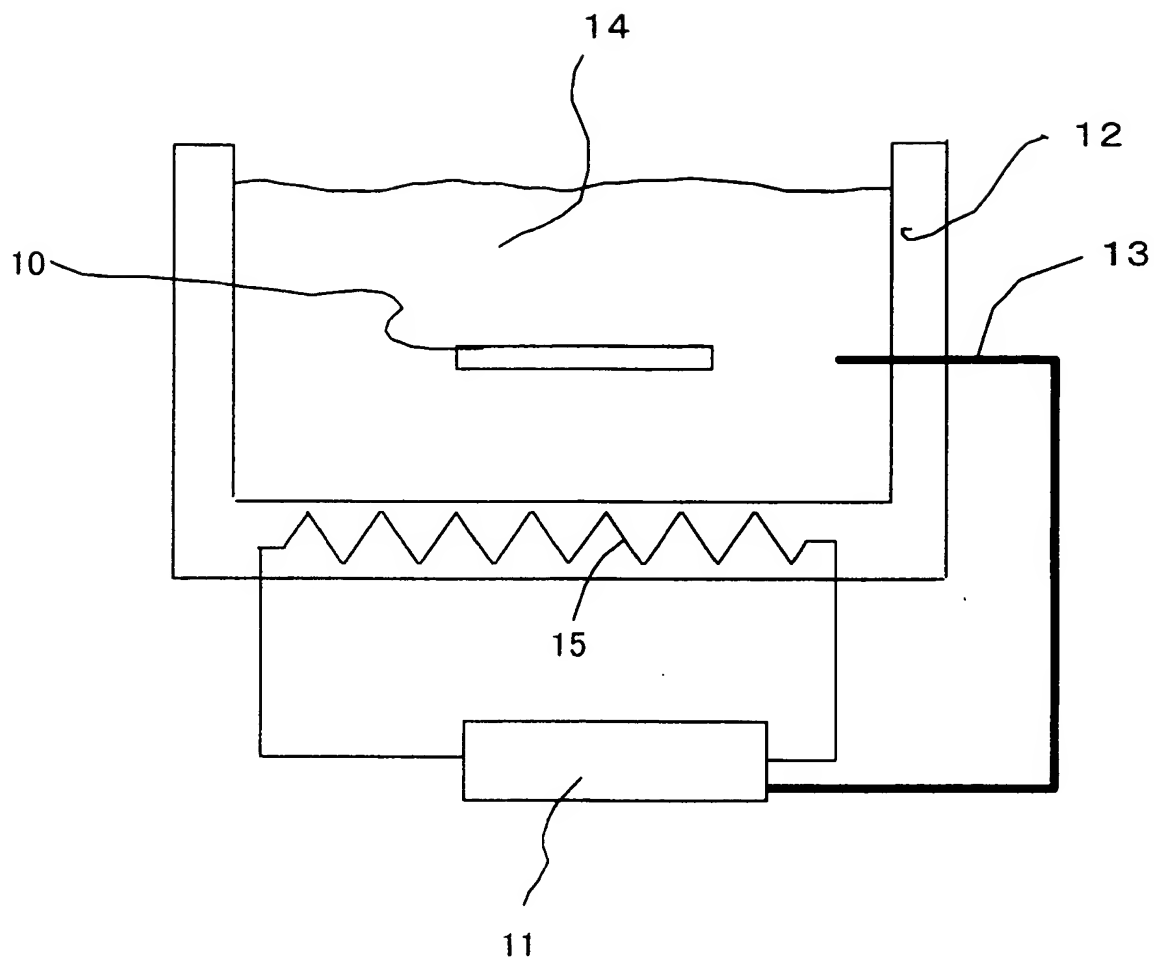
実施例 3 で説明する電子ビームを用いたパターンニング装置の概略図である。

**【符号の説明】**

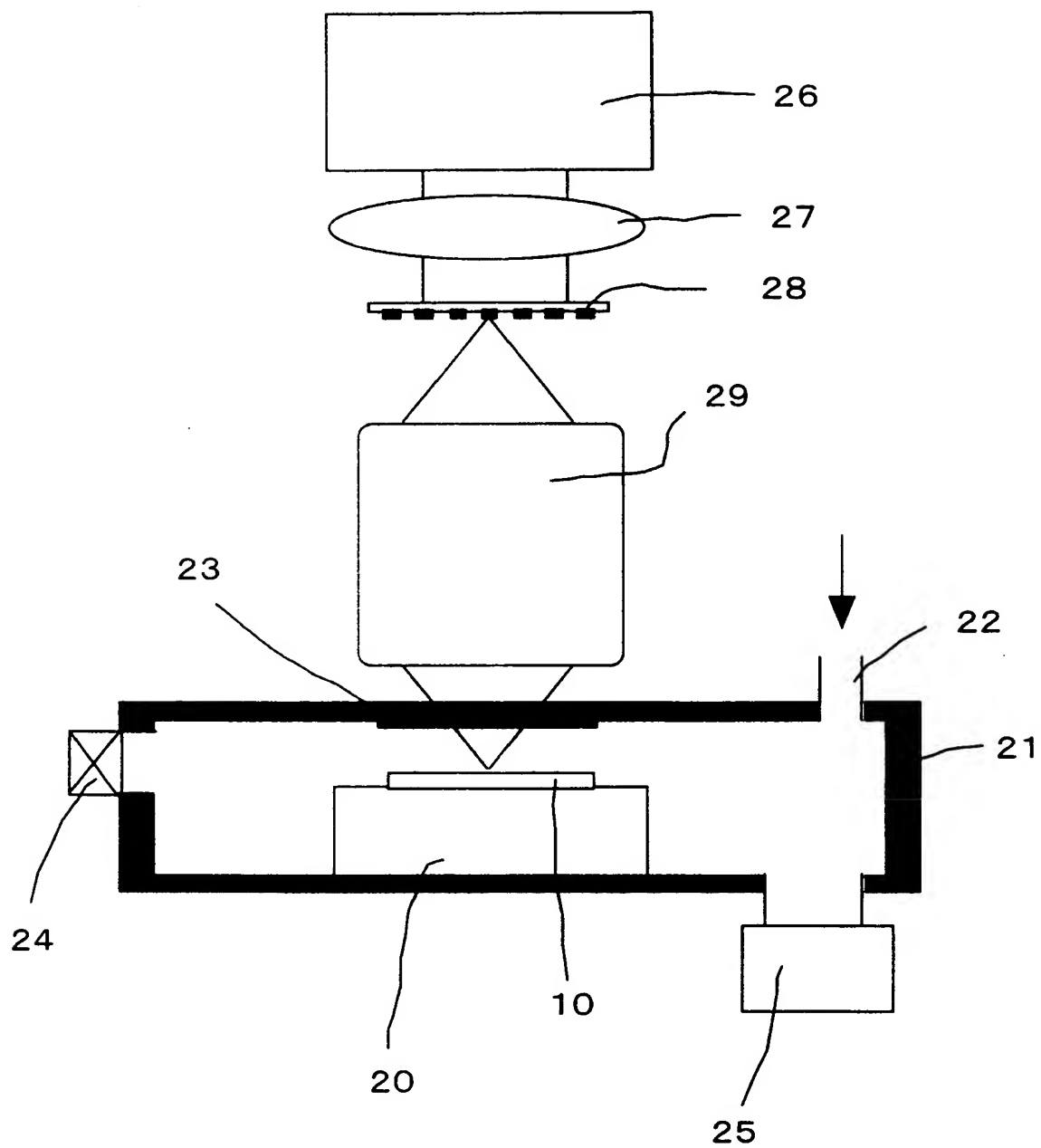
- 10 : 基板
- 11 : 電源
- 12 : 溶液槽
- 13 : 温度測定素子
- 14 : 溶液
- 15 : ヒータ
- 20 : 試料保持台
- 21 : 潜像室
- 22 : ガス導入口
- 23 : 光入射窓
- 24 : ゲートバルブ
- 25 : 真空排気装置
- 26 : 光源
- 27 : 照明光学系
- 28 : マスク
- 29 : 投影光学系
- 30 : 金薄膜
- 31 : DNA プローブ
- 40 : 電子銃
- 41 : 電子ビーム発生部
- 42 : 電子光学系
- 43 : 電子ビーム

【書類名】 図面

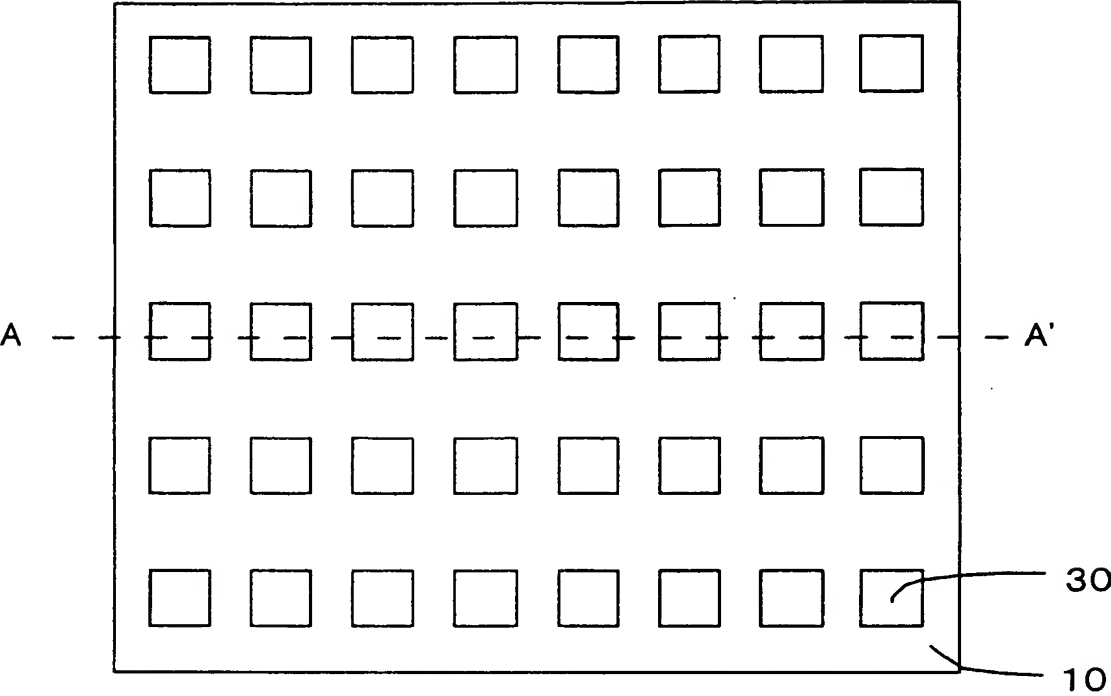
【図 1】



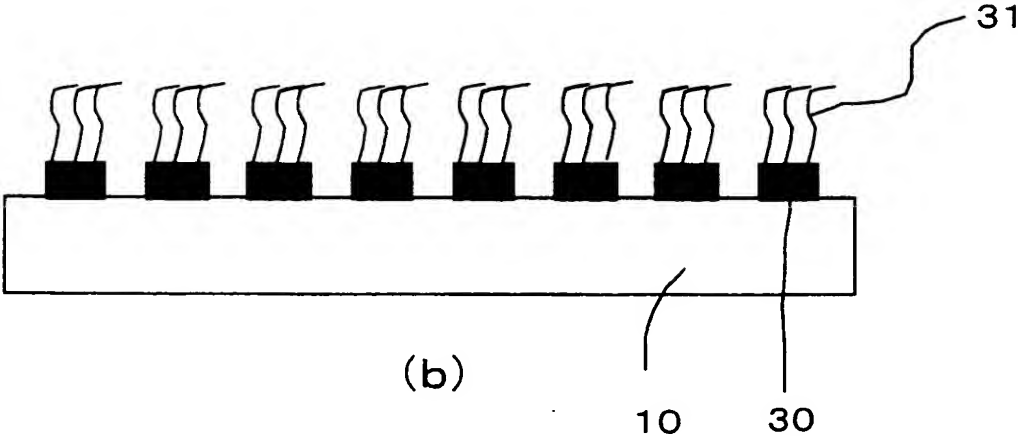
【図 2】



【図 3】

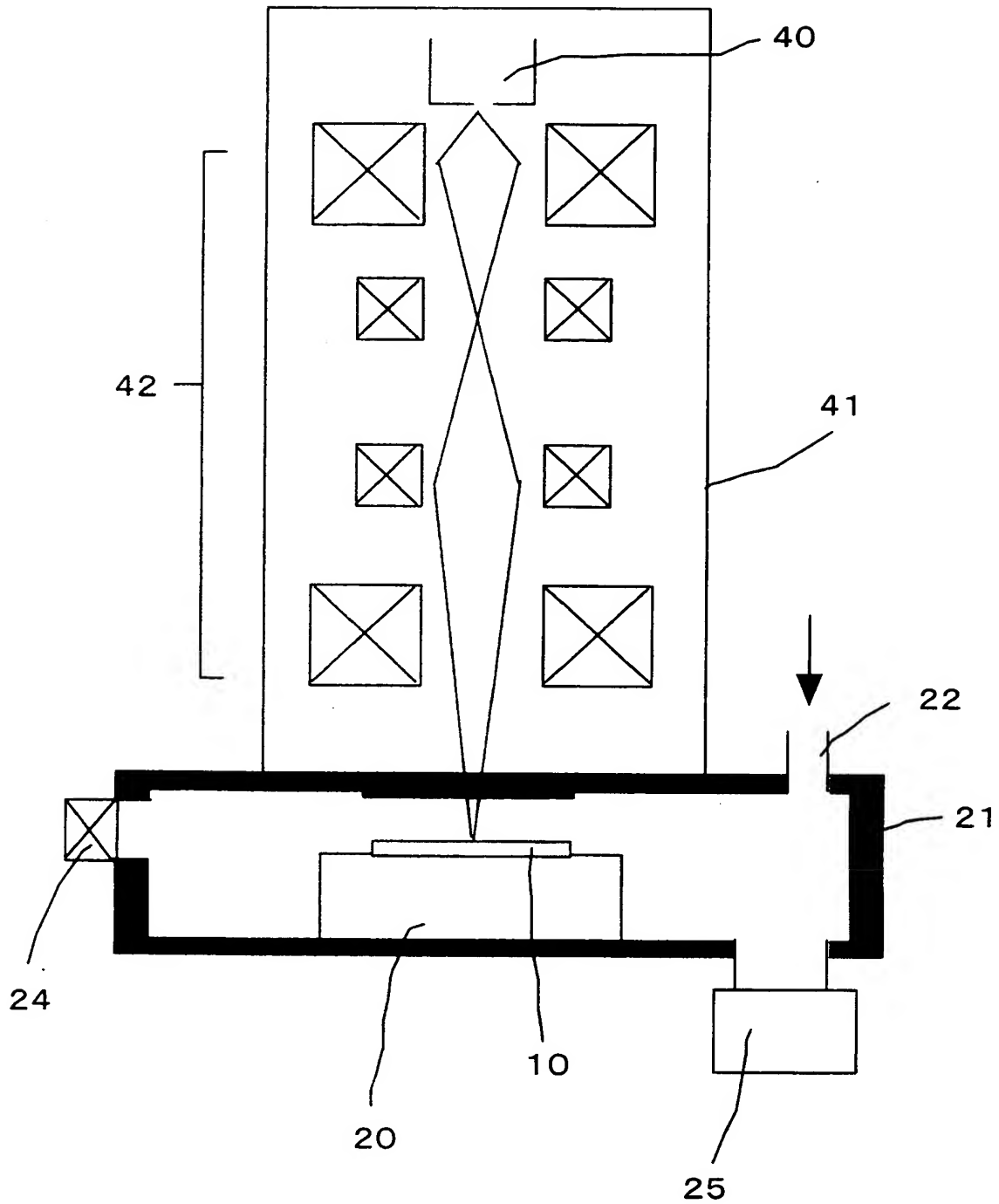


(a)



(b)

【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効果的に一本鎖DNAプローブを担体に固定化でき、かつ走査型プローブ顕微鏡及びその派生技術の手法を用いて正確に担体上に固定されたプローブのドットやスポットの形状等を観察し得る構造を有するプローブ担体を提供すること。

【解決手段】 担体の一本鎖DNAプローブが固定される領域に金を含む膜を形成し、この膜に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブを固定する。

【選択図】 図 3

特願 2 0 0 2 - 1 9 1 2 2 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 0 0 7 ]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キヤノン株式会社